

На правах рукописи

СУЛЕЙМАНОВА АЛИЯ ДАМИРОВНА

**НОВАЯ ГИСТИДИНОВАЯ КИСЛАЯ ФИТАЗА *PANTOEA VAGANS*:
ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"
Госманов Рауис Госманович

кандидат биологических наук, заведующий отделом сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ Татарский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии
Зенон Сташевски

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН**, г. Казань

Защита диссертации состоится « 31 » октября 2013 г. в 13.00 ч на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, аудитория №211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан « » сентября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Острой проблемой биосферы в настоящее время является восполнение исчерпаемых и невозобновляемых ресурсов неорганического фосфата. В почве органическая форма фосфора представлена в основном в виде солей фитиновой кислоты. Они составляют до 50% от общего органического фосфора почв и являются резервуарами фосфора в семенах растений в процессе их созревания. Соли фитиновой кислоты, будучи сильными хелатирующими агентами, связывают катионы двухвалентных металлов, а также остатки аминокислот с образованием труднодоступных соединений (Fugthong, Protein Expression and Purification, 2010). Их гидролиз в природе осуществляется ферментами – фитазами, что является основой для создания инновационной биотехнологии на основе микробных ферментов.

Микробные фитазы привлекают особое внимание биотехнологов для практического использования в животноводстве, сельском хозяйстве и охране окружающей среды. Фитазы микроорганизмов уже сегодня активно применяются в качестве кормовых добавок (Подобед, Энзим., 2007), а в будущем могут стать альтернативой использованию фосфорных удобрений. Кроме того, использование фитат-гидролизующих ферментов может внести вклад в получение специфических изомеров *мио*-инозитол фосфатов - терапевтических соединений, химический синтез которых затруднен (Carlsson, Can. J. Microbiol., 2006). Установлено, что *мио*-инозитол фосфаты являются важными компонентами сигнальных систем всех живых организмов и поэтому обладают фармакологическими свойствами: уменьшают интенсивность симптомов сердечно-сосудистых заболеваний (Jariwalla, Drugs Exp. Clin. Res., 2001), служат профилактикой образования камней в почках (Grases, J. Nutr. Biochem., 2001), снижают риск возникновения рака толстой кишки (Vucenik, J. Nutr., 2003). Положение фосфатной группы в инозитольном кольце влияет на физиологические функции соединения. Фитазы гидролизуют *мио*-инозитол гексакисфосфаты последовательно и стереоспецифично, поэтому получение предшественников *мио*-инозитол фосфатов и свободного *мио*-инозитола с помощью фитаз является потенциальной альтернативой химическому синтезу.

Таким образом, актуальным направлением для создания прогрессивных микробных биотехнологий является поиск новых бактериальных продуцентов фитаз и изучение ферментов.

Цель работы – поиск и получение нового продуцента фитазы, выделение, очистка и характеристика свойств фермента.

Основные **задачи** исследования:

1. Выделить и идентифицировать продуценты фитаз из почв различных регионов Татарстана.
2. Разработать способ выделения и очистки гомогенного препарата фитазы из клеточного лизата *Pantoea vagans* 3.2.
3. Определить и провести анализ первичной структуры фитазы; установить классификационную принадлежность фермента.
4. Исследовать энзиматические свойства бактериальной фитазы.
5. Выяснить механизм гидролиза фитата фитазой *Pantoea vagans* 3.2.

Научная новизна

Впервые из образцов почвы республики Татарстан изолирован микроорганизм, обладающий фитат-гидролизующей активностью – *Pantoea vagans* 3.2. Разработан эффективный способ очистки фитазы из клеточного лизата бактерии *P. vagans* 3.2 и получен гомогенный препарат фермента. Впервые установлена первичная структура фитазы *P. vagans* 3.2, изучены кинетические характеристики, энзиматические свойства и субстратная специфичность фермента. Получены приоритетные данные о механизме гидролиза фитата фитазой *P. vagans* 3.2 и стереоспецифичности фермента; установлен конечный продукт реакции гидролиза – D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфат.

Практическая значимость результатов

Выделенные из почв Республики Татарстан штаммы микроорганизмов могут быть использованы в агробиотехнологии в качестве экологически чистого биоудобрения, увеличивающего доступность фосфора для питания растений, а также в ветеринарии в качестве источника новых кормовых добавок для сельскохозяйственных животных. Разработанный способ очистки фитат-гидролизующего фермента *Pantoea vagans* 3.2, полученные знания о его свойствах и стереоспецифичности открывают перспективу использования фитазы *P. vagans* 3.2 в качестве основы для новой экологически чистой технологии получения D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфата.

Связь работы с научными программами.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета (№ гос. регистрации 01:02.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ 12-08-00942а, грантами Германской службы академических обменов DAAD по программе «Евгений Завойский» № А/11/93749 и № А/12/71705, грантами для молодых ученых от Академии наук республики Татарстан №13-20/Г-2010 и №13-24/2011, Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры

инновационной России» 2009-2013 гг.: ГК № П344, ГК № П406, ГК № П323, ГК № 815, ГК № 1053, соглашения №14.132.21.1786 и 14.А18.21.0575.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изолирован и идентифицирован новый продуцент фитазы *Pantoea vagans* 3.2 и разработан метод получения гомогенного препарата фермента.
2. Фитаза *P. vagans* 3.2 выделена и классифицирована как гистидиновая кислая фосфатаза.
3. Фитаза *P. vagans* 3.2 является 3-фитазой и отщепляет остаток фосфорной кислоты у третьего атома углерода в инозитольном кольце; конечным продуктом гидролиза фитата является D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфат.

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены на международных научных конференциях «SymBioSE 2009, 2010, 2011, 2012», Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ 2013 (FEBS) «Биологические механизмы», III Ежегодной Международной научно-практической конференции по биологии для студентов, магистрантов и аспирантов Тбилисского государственного университета им. Иванэ Джавахишвили (Тбилиси, Грузия, 2011), XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ-2012», МГУ, (Москва, 2012), «История и достижения Казанской биохимической школы» (Казань, 2009), «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012), XIV Международной конференции «Ферменты микроорганизмов в биологии и медицине» посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха (Казань, 2009), Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии», (Казань, 2010), открытом конкурсе научных работ студентов и аспирантов им. Н.И. Лобачевского (Казань, РФ, 2012), Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань, РФ, 2010, 2011, 2012, 2013), III-й Межрегиональной конференции молодых ученых и инноваторов «ИННО-КАСПИЙ» (Астрахань, 2012), XI Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 30 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертации.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору кафедры микробиологии М.Р.

Шариповой за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и обсуждение полученных результатов; к.б.н., доц. А.М. Мардановой и к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан за постоянные консультации и обсуждение результатов; профессору Ральфу Грайнеру за научную консультацию в области выделения, очистки и свойств фитаз микроорганизмов, а также за возможность проведения исследований на базе Института Макса Рубнера г. Карлсруэ, Германия; профессору Гюнтеру Лохниту (г. Гиссен, Германия) за проведение MALDI-TOF масс-спектрометрии; профессору Фикреттину Шахину за сотрудничество и возможность проведения экспериментов по утилизации труднодоступных соединений в лаборатории университета Йедитепе г. Стамбул, Турция. Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского федерального университета д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской и всем сотрудникам кафедры за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

Структура и объём диссертации. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 8 таблицы и 34 рисунков. Библиография содержит 119 наименований российских и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор фитат-гидролизующих бактерий. Пробы почв отбирали в сентябре 2009 года на территориях Республики Татарстан РФ: ГУП Агрокомбинат «Майский» г. Казань; лес деревни Агерзе Азнакаевского района; приусадебное хозяйство села Нармонка Лаишевского района; приусадебное хозяйство села Нижний Услон; городской палисадник (КФУ); Казанский Тепличный совхоз. Учёт микроорганизмов, способных гидролизовать фитат, проводили методом посева на селективную питательную среду PSM.

Питательные среды и условия культивирования. Культивирование микроорганизмов проводили на среде LB (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Селекцию фитат-гидролизующих штаммов проводили на среде PSM (Phytase Screening Medium) (Sasirekha, Euro. J. Exp. Bio., 2012). Способность микроорганизмов использовать фитат в качестве единственного источника фосфора и углерода исследовали на среде MM9 (Escobin-Mopera, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012). При анализе способности микроорганизмов к утилизации труднодоступных источников фосфора использовали среду NBRIP (Nautiyal, FEMS Microbiol. Lett., 1999).

Идентификация штамма микроорганизма. Для молекулярно-генетической идентификации штамма ген, кодирующий 16S рРНК

амплифицировали с помощью ПЦР, используя стандартные праймеры: 27F (5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') и 1492R (5' TACCTTGTTACGACTT 3').

Анализ мультилокусных последовательностей (MLSA) проводили на основе шести генов домашнего хозяйства, последовательности которых для рода *Pantoea* находятся на общедоступном MLST веб-сервере (<http://www.pasteur.fr>). Нами были использованы локусы протяженностью 300-650 п.о. шести белок-кодирующих генов: *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rpl* и *rpoB*, нуклеотидные последовательности которых для штамма *Pantoea* sp. 3.2. получили при скрининге полного генома бактерии. Локусы анализируемых генов объединяли в общую последовательность протяженностью в 2832 п.о., как описано в методике (Deletoile, J. Clin. Microbiol., 2009), и проводили филогенетический анализ для определения вида изолята.

Секвенирование генома *Pantoea* sp. 3.2. проводили в НИИ Физико-химической медицины (г. Москва, Россия) в рамках проекта Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК №16.522.11-2003 «Физико-химическая молекулярная биология ответа про- и эукариотических клеток на экзогенные и эндогенные факторы». Секвенирование проводила на секвенаторе Ion Torrent Personal Genome Machine.

Получение клеточного лизата. Клетки освобождали от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 8000 об/мин, подвергали процедуре замораживания-оттаивания при -80°C, ресуспендировали в 20 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5 и разрушали ультразвуком (20-50 кГц). Добавляли лизоцим в концентрации 1 мг/мл и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Клеточный лизат центрифугировали 30 мин при 15000 об/мин.

Локализацию фитазы определяли измерением уровня фитазной активности по гидролизу фитата натрия в клеточных фракциях. Фракционирование проводили по методике (Tsfasman, Biochemistry, 2000).

Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ оптической единице (опт. ед.) в кювете толщиной 1 см, и по методу Брэдфорд (Bradford, Analyt. Biochem., 1976).

Активность фермента по гидролизу субстрата фитата натрия определяли по количеству высвободившегося фосфора по методу Грайнера (Greiner R., The protein Journal, 2004). Реакционная смесь содержала 100 мкл 10 мМ фитата натрия, 250 мкл 100 мМ Na-ацетатного буфера, pH 4.5, 5-50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали в течении 30 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 1.5 мл свежеприготовленного ААМ-реагента.

Выделение и очистку фитазы *P. vagans* 3.2. проводили из клеточного лизата, полученного после разрушения клеток. Для очистки использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию на колонках MonoS HR 5/5 в 50

мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5 и MonoQ HR 5/5 в 50 мМ Трис-ацетатном буфере, pH 7.8 с последующей гель-фильтрацией белка на колонке 16/60 Sephacryl S-100 HR в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5. Степень чистоты фермента и молекулярную массу определяли методом электрофореза в 12,5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmli, Nature, 1970).

Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF) проводили в лаборатории PROTEIN ANALYTICS (г. Гиссен, Германия). Раствор фермента обрабатывали трипсином по методике, изложенной на сайте (<http://www.bioc.uzh.ch>). Полученные пептиды различной молекулярной массы идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF («ThermoBioanalysis», Великобритания). Данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint и Peptide Mass.

Энзиматические свойства фитазы.

pH-оптимум и pH-стабильность. pH-Оптимум активности фермента определяли по гидролизу фитата натрия при 37°C в интервале значений pH от 1.0 до 9.0 с шагом 0.5 единицы pH. Для определения pH-стабильности фермент предварительно инкубировали при значениях pH от 1.0 до 9.0 в течение 1 ч при комнатной температуре, затем определяли активность по стандартной методике.

Температурный оптимум и термостабильность. Температурный оптимум действия фермента определяли по гидролизу фитата натрия в 100 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5, в интервале температур от 10 до 80°C. При изучении термостабильности фермент предварительно инкубировали 1 ч при температурах от 10° до 80° C, охлаждали до 4°C, затем определяли активность фитазы по гидролизу фитата по стандартной методике.

Влияние ионов металлов на активность фитазы. Использовали сульфат марганца и хлориды кальция, магния, кобальта, железа, цинка и меди в конечной концентрации 1 мМ. К ферментному раствору добавляли растворы двухвалентных металлов и выдерживали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем определяли активность фермента по гидролизу фитата по стандартной методике. Контролем (100 %) служил уровень активности фермента в отсутствии ионов металлов.

Субстратную специфичность фитазы определяли по гидролизу фосфорилированных субстратов в концентрации 2.5 мМ: глюкозо-1-фосфата, фитата, глюкозо-6-фосфата, 2-глицерофосфата, фруктозо-1,6-бифосфата, 1-нафтилфосфата, аденозинтрифосфата (АТФ), пара-нитрофенилфосфата, никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), аденозинмонофосфата (АМФ). Константу Михаэлиса по гидролизу фосфорилированных субстратов рассчитывали по графику в координатах Лайнуивера-Берка в программе Microsoft Excel.

Анализ изомеров инозитолфосфатов с помощью HPLC. Ферментативную реакцию проводили как описано в методике (Ghorbani-Nasrabadi, World J. Microbiol. Biotechnol., 2012). Количественный анализ продуктов гидролиза фитата проводили АОАС-методом (Phytate in foods, anion-exchange method, No. 986.11. In: Official methods of analysis, 1990) с помощью ионообменной обращено-фазной жидкостной хроматографии на колонке Ultrasep ES 100 RP18, как описано в методике (Sandberg, J. Food Sci., 1986).

Идентификация продуктов ферментативного гидролиза. Проводили изомерспецифичную высокоэффективную ионообменную хроматографию (HPLC) 50 мкл образца на аналитической колонке Carbo Pac PA-100 (4 x 250 мм) с градиентом HCl от 5% до 98% (Skoglund, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998).

Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного пакета Clone Manager 6. Филогенетическое древо строили с использованием программного обеспечения MEGA5.1. Анализ пептидов проводили с использованием алгоритма BLAST (Altschul, Nucleic. Acids Research, 1997). Потенциальный сайт отщепления сигнального пептида определяли с использованием алгоритма SignalP 3.0 (Petersen, Nature Methods, 2011). Потенциальные –10 и –35 области идентифицировали при использовании сервера Softberry BPROM network (Hermann, 1995). В биоинформационном анализе геномных локусов использовали базы данных ASAP, Biocyc, coliBASE. Модель 3D-структуры фитазы получена с использованием сервера Phyre2 (Kelley, Nature Protocols, 2009). Третичную структуру фитазы моделировали в программе PyMOL Molecular Graphics System. Для анализа метаболических путей использовали базу данных KEGG Pathway.

Математическая обработка результатов. Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изоляция и идентификация микроорганизмов, способных гидролизовать фитат, в пробах почв Татарстана

Поиск и изоляцию фитат-гидролизующих бактерий проводили из различных образцов почв Республики Татарстан методом посева на селективную питательную среду PSM, содержащую нерастворимый фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. Максимальное количество колоний фитат-гидролизующих бактерий получили из образцов лесной почвы д. Агерзе Азнакаевского района – более 100×10^3 КОЕ / 1 г почвы. Почва ГУП

Агрокомбината «Майский» содержала 29×10^3 КОЕ / 1 г почвы, городского палисадника КФУ – около 7×10^3 КОЕ / 1 г почвы, Казанского Тепличного совхоза – 0.4×10^3 КОЕ / 1 г почвы. В образцах почв из приусадебного хозяйства с. Нижний Услон и с. Нармонки нами не выявлены микроорганизмы, способные гидролизовать фитат. Наличие высокой фитазной активности у бактерий, выделенных из лесной почвы, по-видимому, объясняется отсутствием активного антропогенного воздействия на почву деревенского леса, что позволило сохранить естественный агробиоценоз, в котором присутствовали микроорганизмы различных функциональных групп. Почвы сельскохозяйственных агрокомбинатов, приусадебных хозяйств и городского ландшафта являлись модифицированными, вследствие внесения неорганических и органических удобрений и неблагоприятного воздействия городской среды, что повлекло изменение состава почвенной микрофлоры. Максимальной фитат-гидролизующей активностью на твердых средах обладали штаммы, выделенные из образцов почвы леса д. Агерзе (изоляты 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1) (рис. 1).

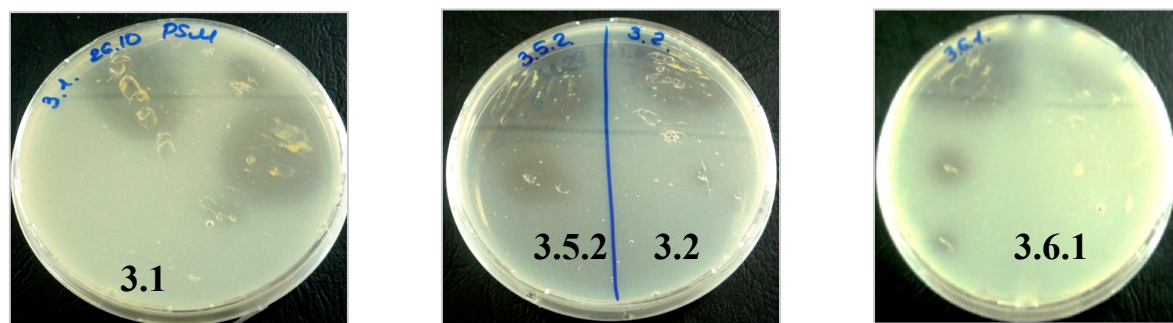


Рис. 1. Зоны гидролиза фитата отобранными изолятами на среде PSM

В культуральной жидкости изучаемых микроорганизмов фитазной активности не выявлено, однако, бактерии обладали способностью расти на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора. Исследовали изменение значений pH среды в процессе культивирования штаммов на жидкой среде PSM. Среду без бактериального роста использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24 часа культивирования pH среды с культурами штаммов 3.1, 3.2, 3.5.2. и 3.6.1 снизился со значения 7.0 до 4.41, 3.75, 3.91 и 3.92, соответственно, тогда как в негативном контроле изменение pH среды было незначительным – с 7.0 до 6.44. Таким образом, формирование зон гидролиза микроорганизмами связано с подкислением pH среды вокруг колонии и переводом нерастворимого фитатного комплекса в растворимое состояние. Для продолжения работы выбрали штамм 3.2, проявляющий максимальную способность к мобилизации фосфатов.

Для определения таксономической принадлежности изолята проводили амплификацию гена 16S рРНК со специфичных праймеров. Анализ последовательности гена, кодирующего 16S рРНК штамма 3.2., позволил отнести

микроорганизм к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Pantoea*. Однако последовательность гена 16S рРНК штамма имела высокую степень гомологии (более 98%) с генами, кодирующими 16S рРНК нескольких видов *Pantoea*: *P. vagans* C9-1, *P. ananatis* AJ13355 и *P. agglomerans* Ast1, что не позволило однозначно определить изолят до вида.

Для дальнейшей идентификации бактерий проводили MLSA-анализ (Multilocus sequence analysis, анализ мультилокусных последовательностей), т.е. анализ последовательностей шести генов домашнего хозяйства бактерии: *fusA* (фактор элонгации белковой цепи EF-G), *gyrB* (ДНК-гираза), *leuS* (лейцин-тРНК-синтетаза), *pyrG* (ЦТФ-синтаза), *rplB* (50S рибосомальный белок L2), *rpoB* (субъединица В РНК-полимеразы) (Deletoile, J. Clin. Microbiol., 2009). Провели скрининг фрагментов (до 650 пар нуклеотидов) шести анализируемых генов в полной геномной последовательности штамма *Pantoea* sp. 3.2. Нуклеотидную последовательность длиной в 2832 п.о., полученную при объединении 6 локусов изучаемых генов, подвергали филогенетическому анализу. Построили филогенетическое древо, по результатам которого выделенный нами изолят имел максимальную гомологию (98%) со штаммом *Pantoea vagans* C9-1 (рис. 2).

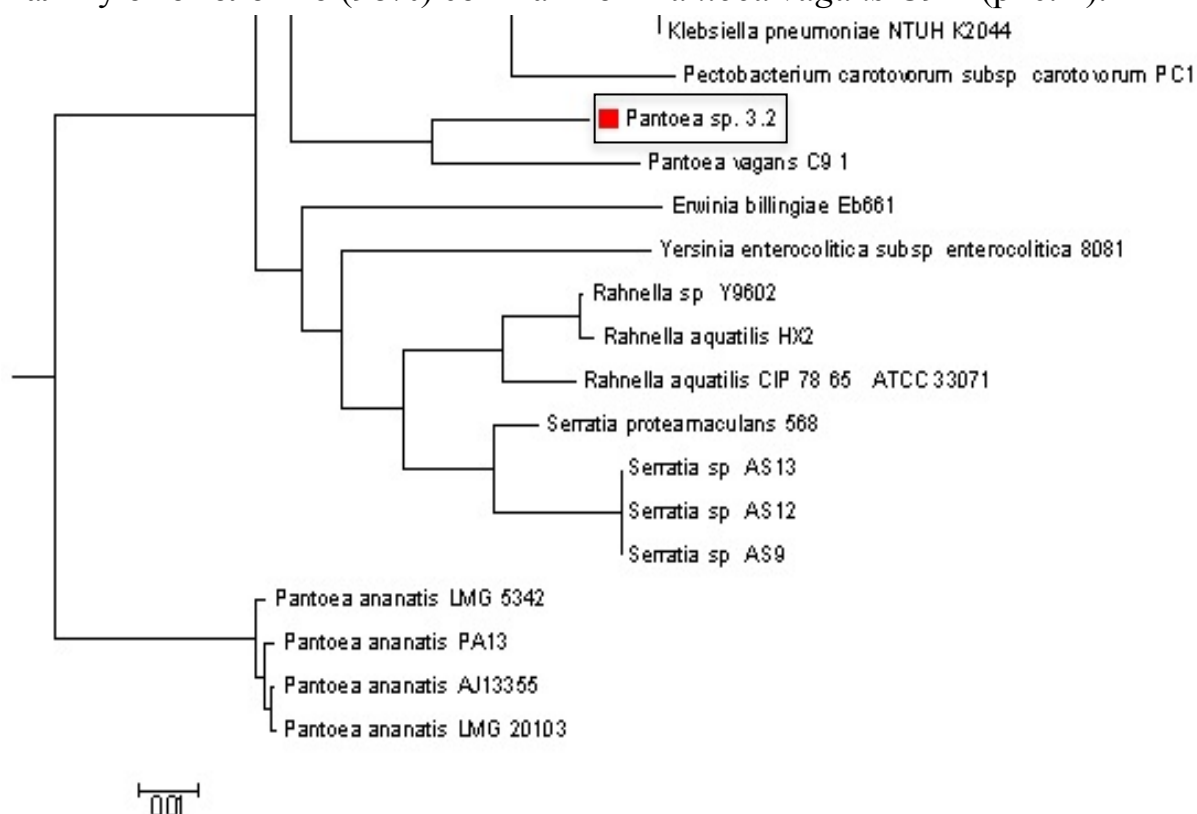


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе MLSA-анализа. Рамкой отмечен штамм *Pantoea* sp. 3.2

Таким образом, по результатам морфологических, биохимических и молекулярно-генетических методов анализа фитат-гидролизующий изолят

идентифицировали как *Pantoea vagans* 3.2. и использовали в дальнейших исследованиях.

Для изучения локализации фитазы исследовали уровень фитазной активности в клеточных фракциях: культуральной жидкости, периплазме, мембране, цитоплазме штамма *P. vagans* 3.2. Максимальную активность обнаружили во фракции периплазмы. В других клеточных фракциях штамма, а также в культуральной жидкости фитазная активность обнаружена в следовых количествах (табл. 1). Полученные данные свидетельствовали, что фитаза *P. vagans* - периплазматический фермент, и конечным местом её функционирования является периплазма клетки.

Табл. 1. Активность фитазы в культуральной жидкости и клеточных фракциях штамма *P. vagans* 3.2

Фракция	Фитазная активность, 10^{-3} ед.акт./мг белка		
	На 12 час роста	На 24 час роста	На 36 час роста
Культуральная жидкость	0	3.6	5
Периплазма	26	32	22
Мембрана	2	3.3	3.8
Цитоплазма	0.3	0.8	1

При исследовании динамики роста и накопления фитазной активности *P. vagans* 3.2. на среде LB показано, что активность фермента появлялась в клеточном лизате на 3-й час роста культуры и сохранялась на протяжении всех фаз роста бактерии (рис. 3А). Однако уровень ее накопления существенно не изменялся после того, как клетки достигали стационарной фазы роста культуры на 16 час культивирования. После 30 часа роста начиналась стадия отмирания клеток (рис. 3А).

Изучали динамику роста штамма *P. vagans* 3.2. на синтетической среде ММ9, содержащей фитат. Показано, что бактерии способны расти в присутствии в среде фитата, как единственного источника фосфора (рис. 3Б). В этих условиях уровень накопления биомассы бактерий ингибировался в среднем на 50% по сравнению с ростом на среде LB. В условиях, когда фитат выступал единственным источником фосфора и углерода, рост бактерий ингибировался на 100% (рис. 3Б). Таким образом, установлено, что бактерии используют соединения фитата в качестве источника фосфора, однако, не способны разрушать инозитольное кольцо для удовлетворения своих потребностей в углероде.

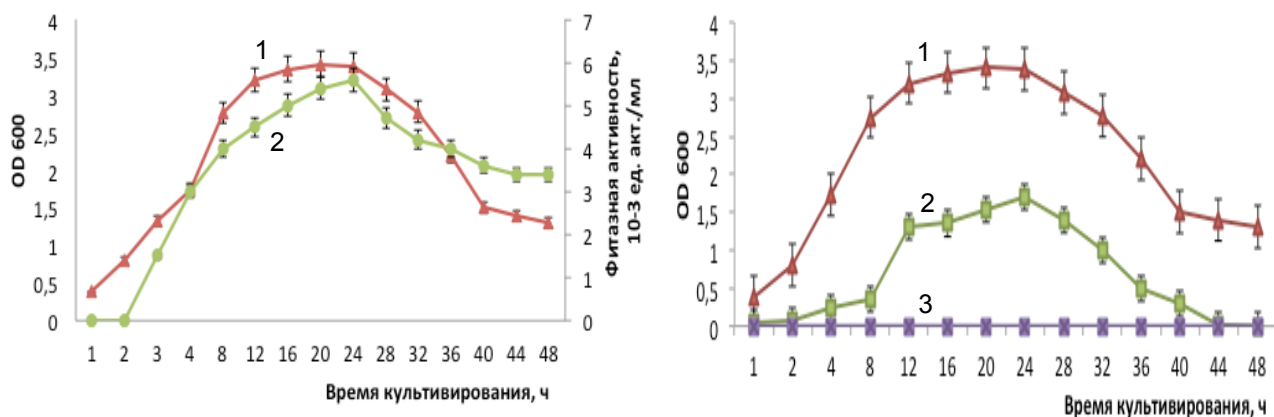


Рис. 3. Динамика роста и накопления фитазной активности *P. vagans* 3.2 на среде LB (А): 1 – рост; 2 – фитазная активность. Динамика роста *P. vagans* 3.2 на лимитированных средах (Б), содержащих фитат в качестве единственного источника фосфора (2), фитат в качестве единственного источника фосфора и углерода (3), и богатой среде LB (1).

2. Выделение и очистка фитазы *P. vagans* 3.2.

Для получения максимального выхода внутриклеточных белков подбирали оптимальный метод разрушения бактериальных клеток *P. vagans* 3.2. Для этого клетки подвергали различным способам разрушения: замораживанию-оттаиванию, действию лизоцима (1 мг/мл) и ультразвука, и их комбинации. Использование каждого из методов по отдельности не привело к высокому выходу внутриклеточных белков, удельная активность фитазы не превышала 1.7×10^{-3} ед. акт./мг. Максимальная удельная активность фермента достигалась при использовании метода замораживания-оттаивания клеток с последующей обработкой их ультразвуком и лизоцимом. Однако добавление к клеточному лизату лизоцима приводило к контаминации, что усложняло процесс очистки целевого фермента, поэтому лизоцим не использовали.

В результате оптимальным способом разрушения клеток *P. vagans* 3.2 выбрана комбинация методов замораживания-оттаивания и ультразвуковой обработки, которая позволила получить из 2 г биомассы белок с максимальной удельной активностью 2.5×10^{-3} ед. акт./мг белка.

Для изучения свойств фитазы, продуцируемой штаммом *P. vagans* 3.2, получали гомогенный препарат белка. Эффективным методом разделения белковых смесей является высокоэффективная жидкостная хроматография. Этот вид хроматографии на колонках MonoS HR 5/5 и MonoQ HR 5/5 с последующей гель-фильтрацией на колонке 16/60 Sephacryl S-100 HR мы использовали для очистки фитазы *P. vagans*. Хроматография клеточного лизата на колонке MonoS HR 5/5 позволила получить препарат фермента с выходом по активности 59.3% и степенью очистки 173. Фермент диализовали и наносили на колонку MonoQ HR

5/5. После хроматографии получали препарат с выходом по активности 37.8% и степенью очистки 582. Затем ферментный раствор подвергали гель-фильтрации на колонке 16/60 Sephacryl S-100 HR. Данные очистки представлены в табл. 2.

Табл. 2. Очистка фитазы *P. vagans*

Стадия очистки	Белок общ., мг	Активность общ., ед. акт.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход по активности, %
Клеточный лизат	262	2.033	0.0078	1	100
Хроматография на колонке MonoS	0.894	1.205	1.35	173	59.3
Хроматография на колонке MonoQ	0.169	0.768	4.54	582	37.8
Гель-фильтрация на колонке Sephacryl S-100	0.01	0.284	28.4	3641	14

Гомогенность белка установлена электрофорезом в 12.5% ПААГ, который показал наличие одного полипептида с молекулярной массой 57 ± 1 кДа (рис. 4).

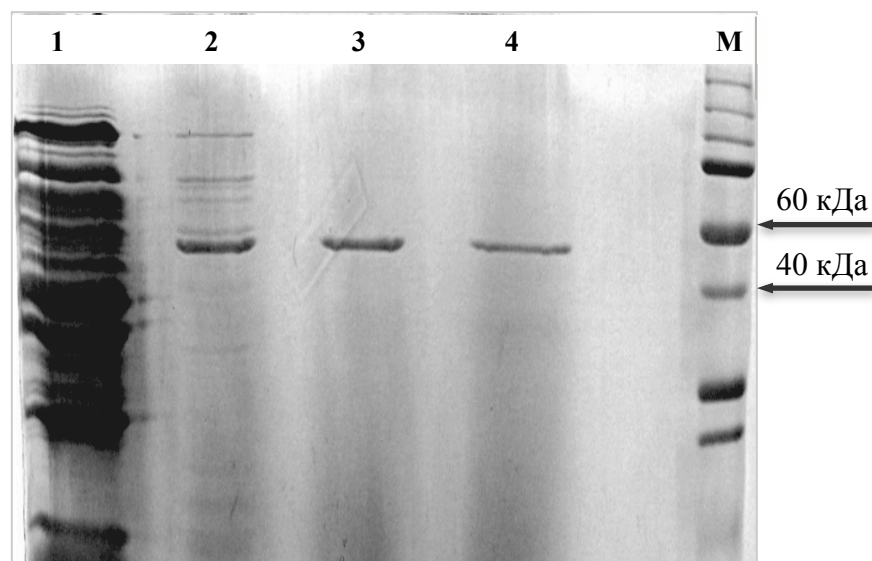


Рис. 4. ПААГ-SDS-электрофорез фитазы на разных стадиях очистки белка: 1 - клеточный экстракт после разрушения клеток, 2 - фракции белка после MonoS, 3 - фракции белка после MonoQ, 4 - фракции белка после гель-фильтрации; М – белковые маркеры молекулярных масс.

В результате хроматографии клеточного лизата получили препарат фитазы со степенью очистки равной 3641 и выходом по активности около 14%. Таким образом, разработанная методика очистки позволила получить гомогенную фитазу *P. vagans* с молекулярной массой 57 ± 1 кДа.

3. Определение аминокислотной последовательности фитазы

Первичную структуру фитазы *P. vagans*, очищенной из клеточного лизата бактерий, устанавливали методом MALDI-TOF - масс-спектрометрии. Полученные данные свидетельствуют, что фитат-гидролизующий фермент *P. vagans* 3.2 включал 581 аминокислотный остаток (рис. 5). С помощью программы SignalP в первичной структуре белка идентифицировали сигнальный пептид протяженностью 30 а.о. Последовательность зрелой фитазы включала 551 а.о., что соответствует молекулярной массе 58522 Да. Наличие сигнального пептида свидетельствовало, что белок секретируется через цитоплазматическую мембрану.

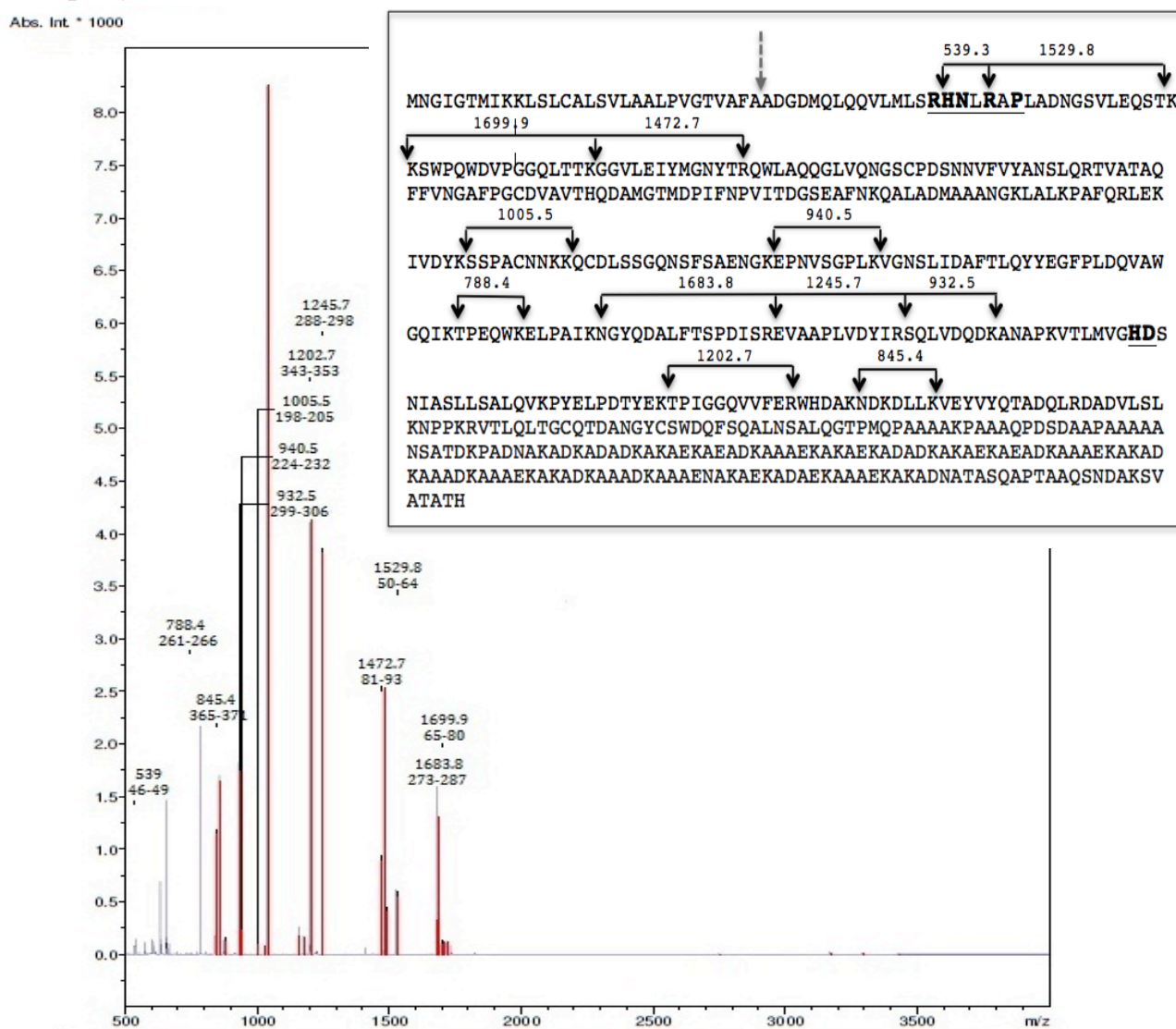


Рис. 5. MALDI-TOF масс-спектрометрия пептидов, полученных в результате обработки фитазы трипсином. В рамке показана аминокислотная последовательность фитазы. Стрелками отмечены связи, гидролизующие трипсином. Над стрелками указаны массы полученных пептидов (Да). Пунктирной стрелкой указан сайт отщепления сигнального пептида. Аминокислоты, образующие активный центр, выделены и подчеркнуты

В установленной первичной структуре фитазы *P. vagans* 3.2. мы идентифицировали консервативные мотивы: N-концевой фрагмент **RHNLRAP** и C-концевой мотив **HD**, которые соответствуют структуре мотива активного центра ферментов класса гистидиновых кислых фосфатаз (рис. 5). В процессе фолдинга эти последовательности сближаются и формируют каталитический центр, обеспечивающий реакцию гидролиза фитата (Rigden, Biochem J., 2008).

Таким образом, зрелая фитаза *P. vagans* 3.2 является периплазматической фитат-гидролизующей гистидиновой кислой фосфатазой (фитазой), состоящей из 551 аминокислотного остатка.

Выравнивание установленной аминокислотной последовательности белка с геномной последовательностью *P. vagans* 3.2 позволило обнаружить в геноме этих бактерий единственный ген фитазы. Открытая рамка считывания гена состояла из 1746 п.о., что соответствует 581 а.о. Сайт инициации трансляции представлен ATG кодоном. При выравнивании нуклеотидной последовательности с последовательностями, находящимися в мировых базах данных (NCBI, ASAP), было обнаружено 84% гомологии с геном глюкозо-1-фосфатазы (*agp*) *P. vagans* C9-1 (YP_003930444.1), 81% гомологии с генами глюкозо-1-фосфатаз *P. ananatis* LMG 5342 (HE617160), *P. ananatis* PA13 (CP003085.1), *P. ananatis* LMG 20103 (CP001875.2), геном-предшественником глюкозо-1-фосфатазы *P. ananatis* AJ13355 (AP012032.1) и 80% гомологии с геном *agp Pantoea* sp. At-9b (CP002433.1). Таким образом, на основании биоинформационного анализа можно предположить, что полученная гомогенная фитаза *P. vagans* 3.2 относится к группе ферментов глюкозо-1-фосфатаз.

Проводили анализ геномного локуса, содержащего ген фитазы. Организация геномного локуса протяженностью 20 000 п. о. высоко консервативна в пределах рода *Pantoea*: ген фитазы (*agp*) имеет одинаковую протяженность и одни и те же соседние гены с 3'- и с 5'-концов (рис.6). Перед геном фитазы (глюкозо-1-фосфатазы) на этой же цепи расположено два гена, кодирующие сериновую tРНК, ген ацилфосфатазы, ген, кодирующий Коэнзим А-связывающий белок (*uscU*) и ген хеликазы IV (*helD*); на другой цепи – гены транспорного белка YccA, сульфатредуктазы YccK, метилтрансферазы YccW, белка теплового шока HspQ, метилглиоксал синтазы MgsA и белка внутренней мембраны YccF. Область после гена *agp P. vagans* консервативна внутри рода: на той же цепи всегда располагается ген белка-транспортера (*yedA*), на противоположной цепи – ген NAD-зависимой сукцинат-альдегид дегидрогеназы (*ssdA*), находящийся в одном опероне с генами цитоплазматического белка YccJ и флавопротеина WrbA, ген пиримидиновой пермеазы, присутствующий в геномах и у других представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri*), однако, отсутствующий у *Pantoea ananatis*.

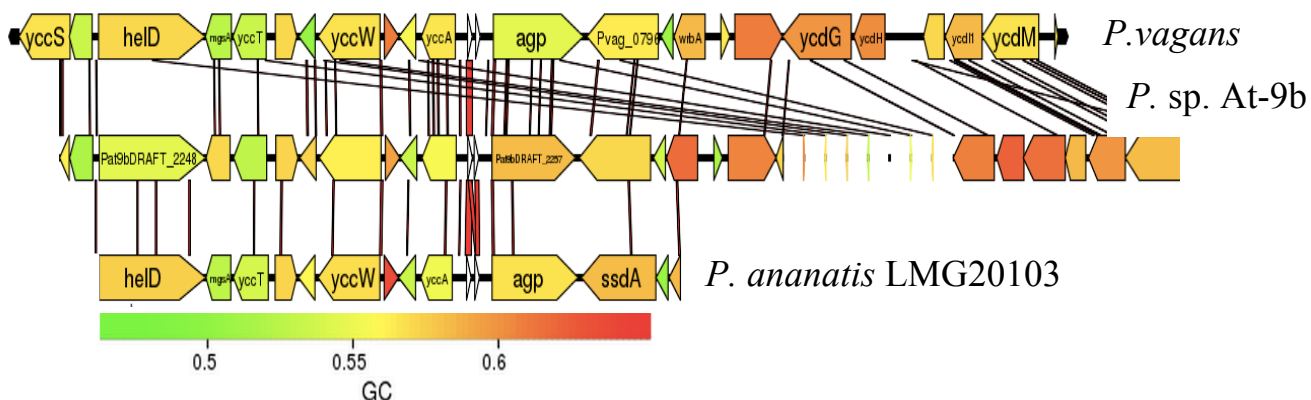


Рис. 6. Структурная организация геномного локуса, содержащего ген глюкозо-1-фосфатазы (*agp*), в геномах *Pantoea* (обозначения генов указаны в тексте). Содержание GC-пар обозначено цветом

Гены *agp* других энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter cloacae*) отличаются протяженностью – в среднем они короче на 500 пар оснований, чем ортологичные гены рода *Pantoea*. Геномный локус с 3'-конца гена глюкозо-1-фосфатазы имеет гетерогенную структуру, в нем не наблюдается гомологии между родами.

Степень консервативности геномных локусов оценивают по содержанию ГЦ-пар в генах или оперонах. Отличие ГЦ-состава гена или оперона от ГЦ-состава генома может свидетельствовать о горизонтальном переносе. Так, ГЦ-состав геномной ДНК *P. vagans* 3.2 равен 55%, а ГЦ-состав гена *agp* – 54.8%. Эволюционная консервативность гена указывает на то, что он играет важную роль в клеточном метаболизме этих бактерий.

4. Свойства фитазы

Определяли рН-оптимум и рН-стабильность фитазы *P. vagans* 3.2. Установлено, что максимуму фитазной активности соответствовало значение рН 4.5 (рис. 7А). Фермент практически не активен при значениях рН ниже 3.0 и выше 6.0. Эти данные указывают, что исследуемый белок относится к группе кислых фосфатаз. Большинство бактериальных гистидиновых кислых фитаз имеют оптимум рН действия в интервале от 4.0 до 5.5 (Huang, J Microbiol Biotechnol., 2009). Белок стабилен в интервале рН от 3.0 до 8.0, но при рН 9.0 сохранялось менее 20% от начальной активности фермента (рис. 7Б).

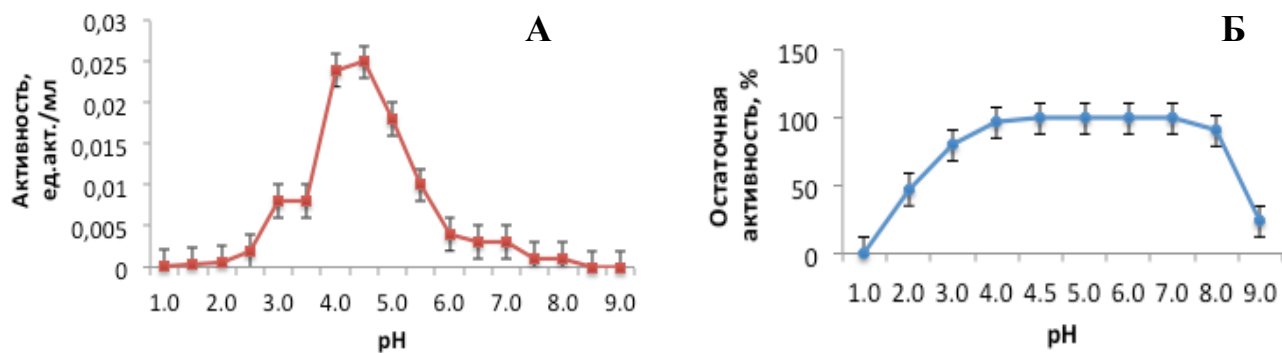


Рис. 7. pH-Оптимум и pH-стабильность фитазы:

А – pH-оптимум фитазы, Б – pH-стабильность фитазы

При исследовании влияния температуры на активность фитазы *P. vagans* 3.2. установлено, что температурный оптимум фермента соответствует 37°C (рис. 8А). Близкий температурный оптимум имеют и другие бактериальные гистидиновые кислые фитазы: фитаза *Erwinia carotovora* var. *carotovota* имеет оптимум активности при 40°C (Huang, J Microbiol Biotechnol., 2009), так же как и фитаза *Obesumbacterium proteus* (Zinin, FEMS Microbiol. Lett., 2004). Фермент сохранял активность при температуре от 10°C до 45°C (рис. 8Б).

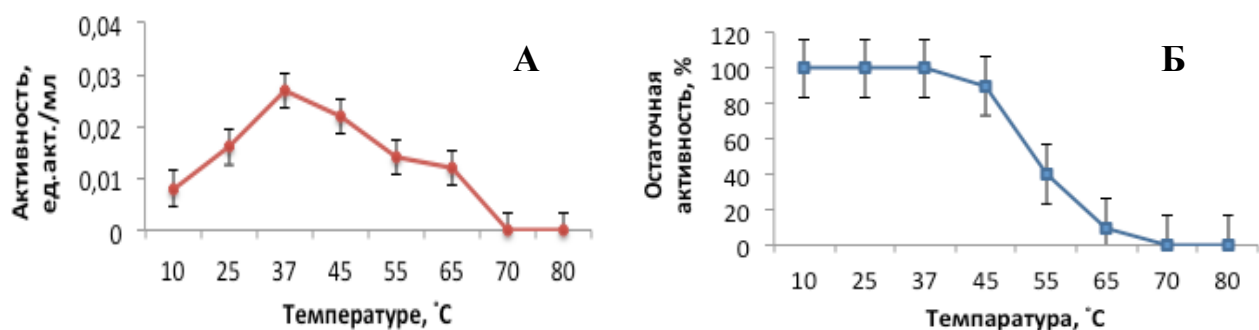


Рис. 8. Влияние температуры на активность фитазы:

А – температурный оптимум фермента, Б – термостабильность фитазы.

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность фермента показало, что ионы Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} в концентрации 1 мМ повышают активность белка в два раза. Ионы Co^{2+} и Fe^{2+} в той же концентрации не влияют на активность фитазы, тогда как ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} ингибировали активность фермента на 42% и 16% соответственно (рис. 9).

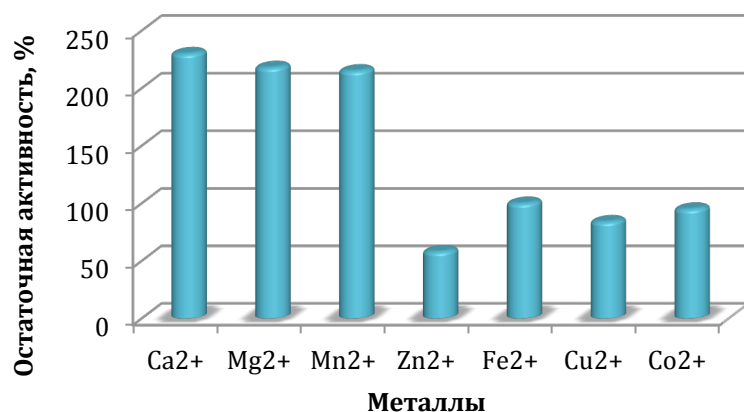


Рис. 9. Влияние ионов двухвалентных металлов в концентрации 1мМ на активность фитазы

Способность ионов Ca^{2+} , Zn^{2+} и Mg^{2+} влиять на активность фитазы подтверждается данными *in silico*. На основании данных первичной структуры построили 3D-модель фитазы *P. vagans* 3.2. На гипотетической модели с помощью программного обеспечения PIONCA (Protein Ion Calculator) (Rahmanov, Journal of Bioinformatics and Computation Biology, 2009) идентифицировали сайты связывания ионов в области активного центра фермента (рис. 10). Таким образом, анализ моделирования свидетельствует, что полученный нами фермент способен активироваться под действием ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , и ингибироваться в присутствии ионов Zn^{2+} .

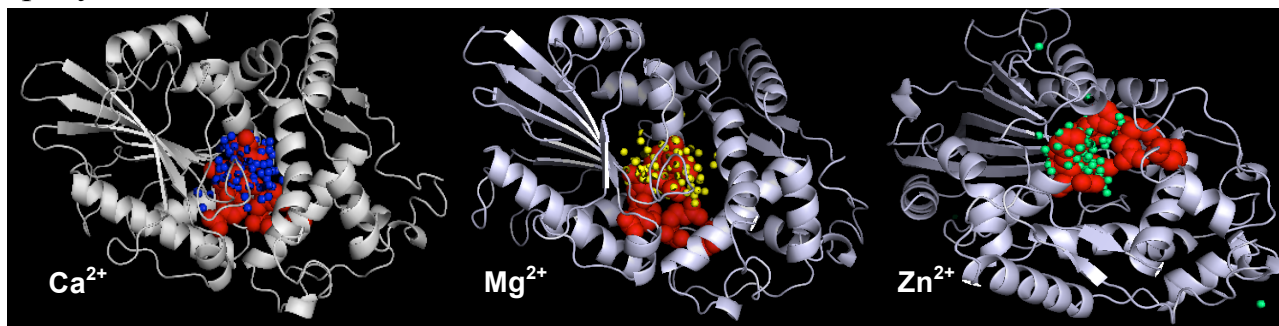


Рис. 10. Гипотетическая 3D-модель фитазы. Красным отмечены аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента. Цветными точками обозначены сайты связывания ионов металлов: синим – ионы кальция, желтым – ионы магния, зеленым – ионы цинка

Исследовали субстратную специфичность фитазы *P. vagans* 3.2. по гидролизу фосфорилированных субстратов: глюкозо-1-фосфата, фитата, глюкозо-6-фосфата, 2-глицерофосфата, фруктозо-1,6-бифосфата, 1-нафтилфосфата, никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), аденозинтрифосфата (АТФ), пара-нитрофенилфосфата, аденозинмонофосфата (АМФ). Фермент осуществлял гидролиз перечисленных субстратов, однако, при оценке константы Михаэлиса лучшими субстратами для фитазы *P. vagans* 3.2. оказались фитат, глюкозо-1-

фосфат и глюкозо-6-фосфат, константы Михаэлиса которых составили 0.28, 0.24 и 0.37, соответственно (табл. 3), что подтверждает наше предположение о принадлежности этого фермента к группе глюкозо-1-фосфатаз.

Табл. 3. Специфичность фитазы по гидролизу синтетических субстратов

Субстрат	K_m
Глюкозо-1-фосфат	0,24
Фитат	0,28
Глюкозо-6-фосфат	0,37
2-глицерофосфат	2
Фруктозо-1,6-бифосфат	2.1
НАДФ	3.7
1-нафтилфосфат	3.9
АТФ	4.3
Пара-нитрофенилфосфат	5,4
АМФ	5.9

5. Идентификация продуктов ферментативного гидролиза фитата

В процессе микробной деструкции фитата остатки фосфорной кислоты высвобождаются в разной очередности и с различной скоростью. Для изучения механизма действия фитазы *P. vagans* 3.2 на фитат, продукты гидролиза разделяли и идентифицировали при помощи ионообменной HPLC хроматографии. Через восемь часов инкубации фермента с субстратом в реакционной смеси наблюдали снижение концентрации инозитол гексафосфата (фитата) с 3.5 мМ до 2 мМ. После второго часа инкубации в смеси обнаружили инозитол пентафосфат, концентрация которого увеличивалась и к восьмому часу достигала 1.3 мМ, тогда как концентрация фитата снижалась в 1.5 раза (рис. 11). Накопления других менее фосфорилированных производных инозитол фосфатов не обнаружили, что свидетельствует о том, что инозитол пентафосфат является единственным продуктом гидролиза фитата фитазой *P. vagans* 3.2.

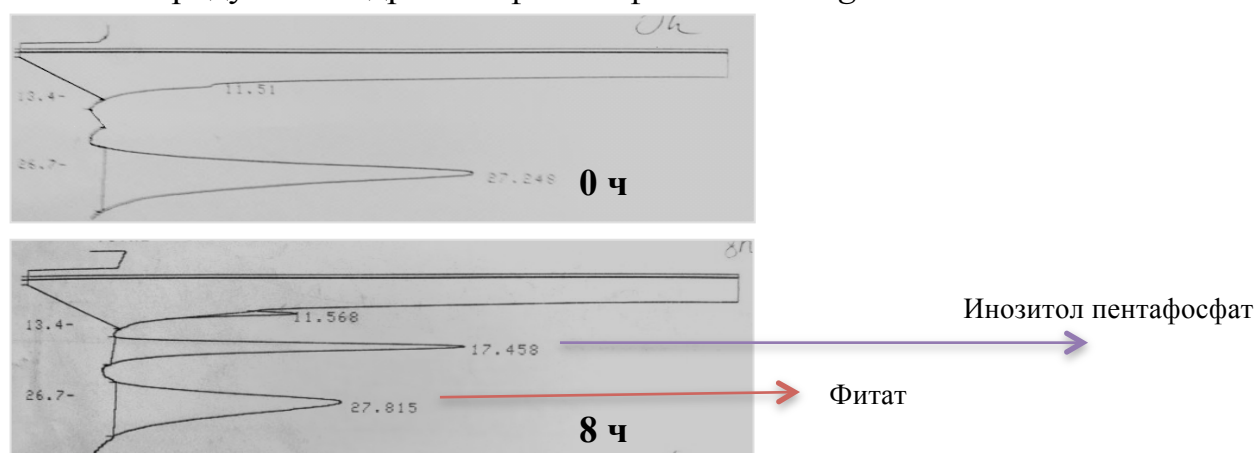


Рис. 11. HPLC-анализ продуктов гидролиза фитата фитазой *P. vagans* 3.2.

Идентификацию продуктов ферментативного гидролиза фитата проводили с помощью изомер-специфичной высокоэффективной ионообменной

хроматографии (HPLC). По результатам анализа D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфат является единственным конечным продуктом гидролиза фитата фитазой *P. vagans* 3.2 (рис. 12).

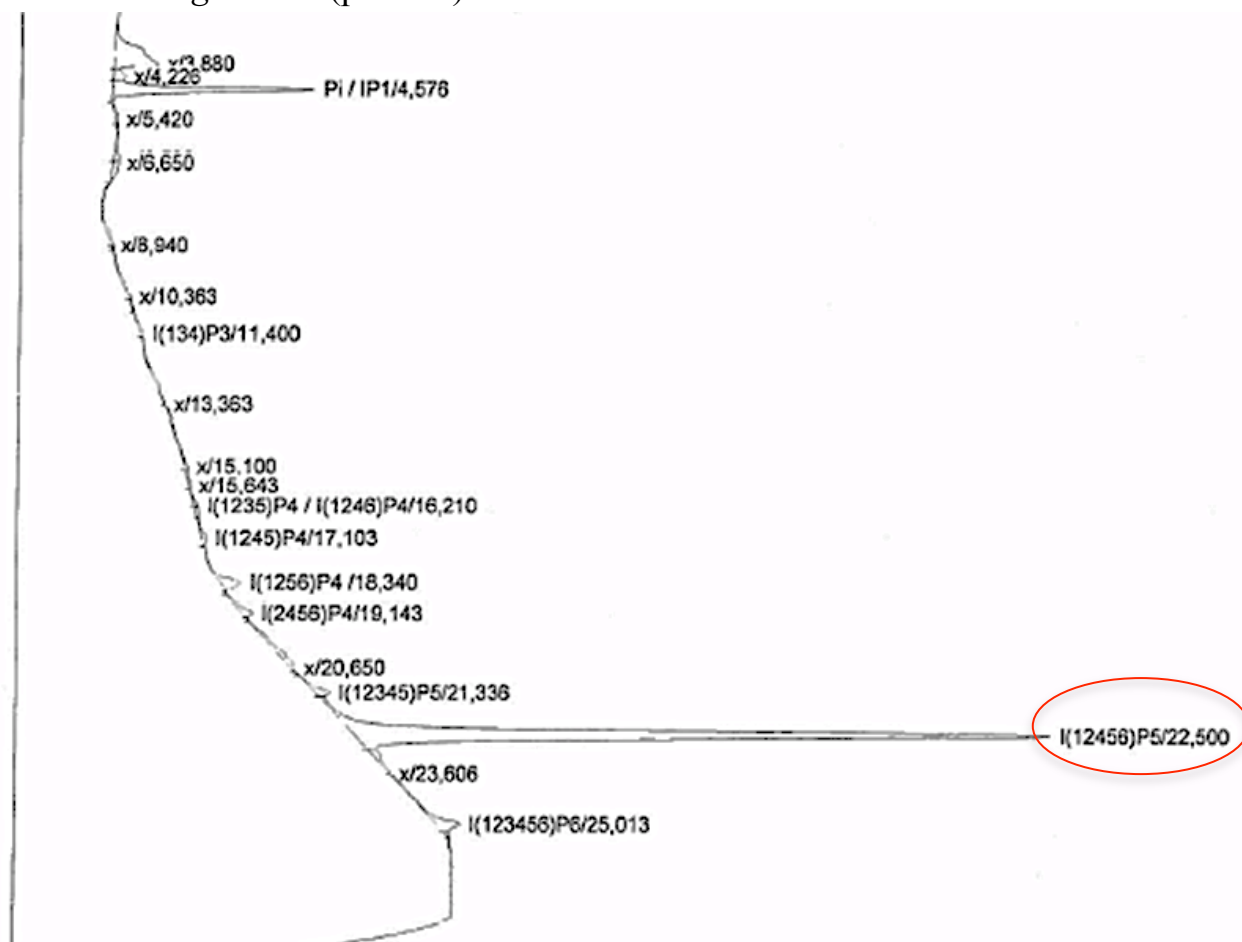


Рис. 12. HPLC-анализ продуктов гидролиза мио-инозитол гексакисфосфата фитазой *P. vagans* 3.2.

Таким образом, установлено, что конечным продуктом гидролиза фитата фитазой *P. vagans* 3.2 являлся D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфат, что позволило классифицировать выделенный нами фермент как 3-фитазу по высвобождению фосфата у третьего углерода в инозитольном кольце.

Алгоритм программы KEGG позволяет на основе генома реконструировать пути метаболизма бактерий. Проведенный нами анализ позволил оценить вклад белка Agr (фитазы) в метаболизм *Pantoea vagans* C9-1 – ближайшего филогенетического родственника *P. vagans* 3.2 (рис. 2). Роль Agr-белка предсказана лишь в процессах гликолиза – фермент катализирует отщепление фосфатной группы от α-D-глюкозо-1-фосфата с образованием α-D-глюкозы. На основании более широкой субстратной специфичности фермента (табл. 3), мы проанализировали метаболизм инозитол фосфатов бактерии. При KEGG-анализе метаболизма инозитол фосфатов штаммом *P. vagans* C9-1 установлено, что гидролиз мио-инозитол гексакисфосфата (фитата) бактерии ведут двумя путями – с образованием инозитол-1,2,3,4,5-пентакисфосфата (1) и инозитол-1,2,4,5,6-

пентакисфосфата (2) (рис. 13). Фермент, отщепляющий фосфат от шестого углерода в инозитольном кольце, идентифицирован в геноме *P. vagans* C9-1 как PhyK. PhyK является гистидиновой кислой фитазой и состоит из 416 а.о. Фермент, ведущий гидролиз вторым путем, до настоящего времени в геноме не идентифицирован. Полученные нами данные по стереоспецифичности фитазы выделенной из *P. vagans* 3.2, позволяют предположить, что именно этот фермент ведет гидролиз фитата по второму пути с образованием D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфата. Таким образом, полученный нами фермента участвует не только в процессах гликолиза, но и в альтернативном пути расщепления фитата.

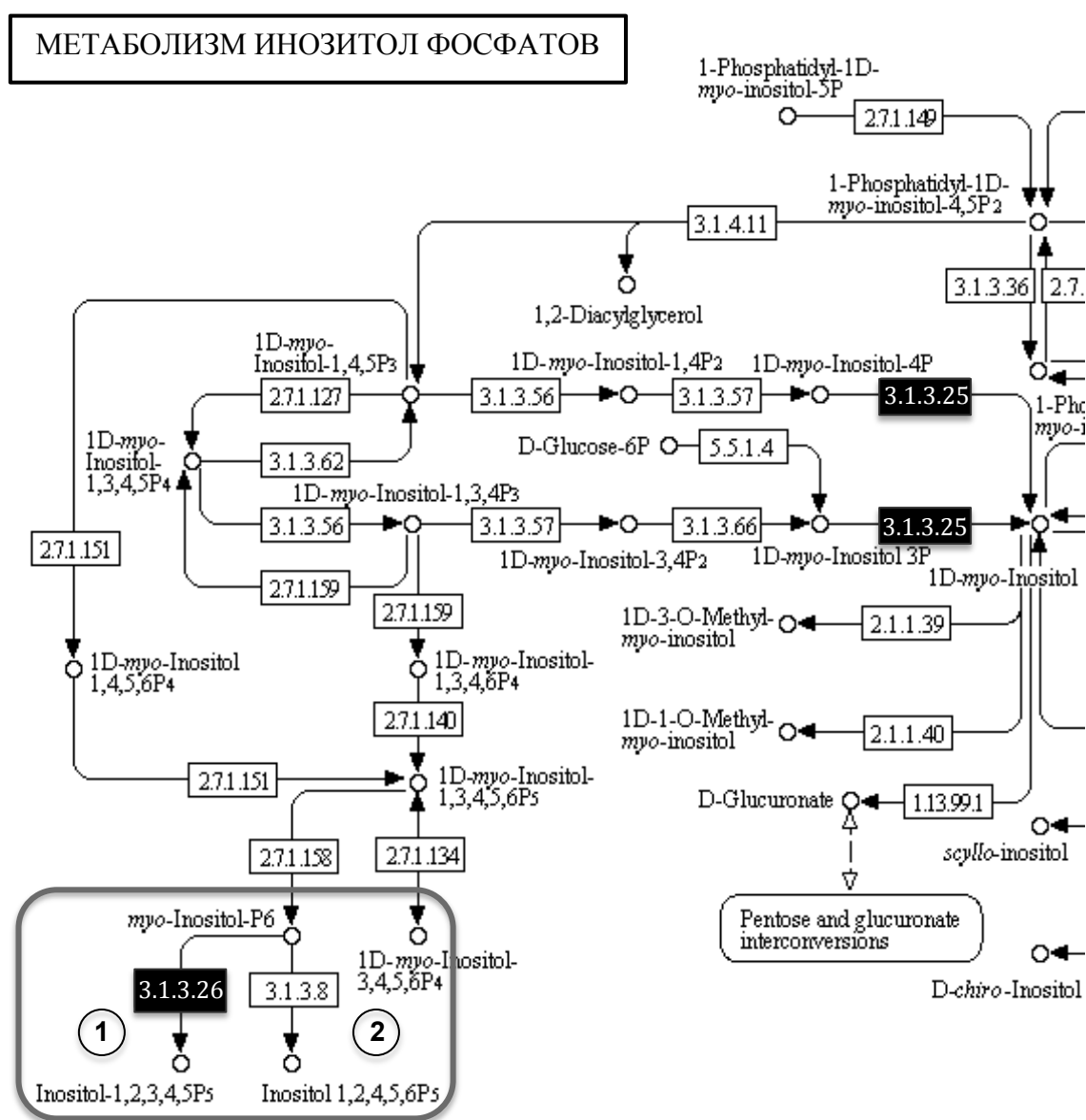


Рис. 13. Анализ путей метаболизма инозитол фосфатов, идентифицированный в последовательности генома *P. vagans* C9-1 с помощью базы данных KEGG. Черным отмечены ферменты, гены которых обнаружены в геноме бактерии, в бесцветной рамке – не идентифицированные белки.

Итак, из различных образцов почв Республики Татарстан нами впервые получен и идентифицирован изолят *Pantoea vagans* 3.2, проявляющий фитат-гидролизующую активность. Фитаза *P. vagans* 3.2. очищена до гомогенного состояния и охарактеризована, установлена ее первичная структура. На основании анализа первичной структуры и свойств фитазы показано, что она относится к семейству гистидиновых кислых фосфатаз - большому классу ферментов, широко представленному среди микроорганизмов, а также встречающемуся у растений и животных. В геноме *P. vagans* 3.2. идентифицирован один ген, конвертированная последовательность которого соответствует последовательности аминокислот выделенного нами фермента. Исследование стереоспецифичности фитазы позволило установить единственный конечный продукт гидролиза этим ферментом субстрата фитата - D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфат.

ВЫВОДЫ:

1. Из проб почв республики Татарстан впервые изолирован и идентифицирован продуцент фитазы *Pantoea vagans* 3.2.
2. Выделена и очищена гомогенная фитаза *P. vagans* 3.2 со степенью очистки 3641 и выходом – 14%. Молекулярная масса фитазы составила 57 кДа.
3. Установлена первичная структура фитазы, фермент классифицирован как гистидиновая кислая фосфатаза.
4. Показано, что фитаза *P. vagans* 3.2 является кислой фосфатазой с рН-оптимумом 4.5 и широкой субстратной специфичностью. Активность ингибируется ионами двувалентных металлов – Fe^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} , активируется – Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} .
5. Установлено, что конечным продуктом гидролиза фитата фитазой *P. vagans* 3.2 является D/L-мио-инозитол-1,2,4,5,6-пентакисфосфат.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сулейманова А. Д., Данилова Ю. В., Грайнер Р., Шарипова М. Р. Новая бактериальная внутриклеточная фитаза энтеробактерий: выделение и характеристика // Биоорганическая химия. – 2013. – Т. 39. - № 4. – С. 424-429. – (перечень ВАК), автора – 0.3 пл.
2. Мухаметзянова А.Д., Маренова И.О., Шарипова М.Р. Получение и характеристика бацилл с инактивированным геном фитазы // Микробиология. - 2013. – Т. 82. - № 1. – С. 52-58. - (перечень ВАК), автора – 0.3 пл.
3. Мухаметзянова А.Д., Ахметова А.И., Шарипова М.Р. Микроорганизмы как продуценты фитаз // Микробиология. – 2012. – Т. 81, - № 3. – С. 291-300. - (перечень ВАК), автора – 0.417 пл.
4. Ахметова А.И., Мухаметзянова А.Д., Шарипова М.Р. Фитазы как основа новых микробных технологий в кормлении животных // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер.

- Естеств. науки. – 2012. – Т. 154, кн. 2. – С. 103–110. - (перечень ВАК), автора – 0.166 пл.
5. Шарипова М.Р., Тойменцева А.А., Сабирова А.Р., **Мухаметзянова А.Д.**, Ахметова А.И., Марданова А.М., Балабан Н.П. Новое филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19 // Микробиология. - 2011. - Т. 80. - № 3. - С. 424-426. - (перечень ВАК), автора – 0.035 пл.
 6. **Мухаметзянова А.Д.** «Изоляция и идентификация продуцентов фитаз, выделенных из образцов почв республики Татарстан» / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Казанская наука. – 2010. – № 12 – С. 24-28. – автора – 0.3 пл.
 7. **Мухаметзянова А.Д.** Микробные фитазы – основа новых биоудобрений для улучшения роста растений / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Казанская наука. – 2010. – №1. – С. 11-13. - автора – 0.3 пл.
 8. **Suleimanova A.** Histidine acid phytase of *Pantoea vagans* / A. Suleimanova, M. Sharipova // FEBS Journal – 2013. - V. 280, Suppl. 1. – P. 494-495.
 9. **Сулейманова А.Д.** Новая внутриклеточная фитаза энтеробактерий: выделение и характеристика / А.Д. Сулейманова, Ю.В. Данилова, Р. Грайнер, М.Р. Шарипова // Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». Уфа: 2013. – С. 278.
 10. Нямсүрэн Ч. Гетерологичная система экспрессии генов в растениях на основе гена бациллярной фитазы / Ч. Нямсүрэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, **А.Д. Сулейманова**, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений». Москва: 2013. - С. 212-213.
 11. Нямсүрэн Ч. Гетерологичная система экспрессии генов на основе гена фитазы бацилл / Ч. Нямсүрэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, **А.Д. Сулейманова**, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов.17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино: 2013. – С. 368-359.
 12. Нямсүрэн Ч. Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, секретирующих микробную фитазу *phyCg Bacillus ginsengihumi* / Ч. Нямсүрэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, **А.Д. Сулейманова**, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Материалы XIII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва: 2013. – С. 39.
 13. **Мухаметзянова А.Д.** Фитазы микроорганизмов как основа новых биоудобрений для улучшения роста растений / А.Д. Мухаметзянова, И.И. Маренова, М.Р. Шарипова // Сборник материалов 1-й Молодежной конференции «Молодые ученые аграрной науки Евро-северо-востока». Киров: 2013. – С. 54-56.
 14. **Мухаметзянова А.Д.** Выделение, очистка и свойства фитат-гидролизующего фермента *P. agglomerans* / А.Д. Мухаметзянова, И.И. Маренова, М.Р. Шарипова // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века». Москва: 2012. - С. 618.
 15. Маренова И.И. Влияние инактивации гена фитазы на жизнедеятельность штамма *Bacillus subtilis* / И.И. Маренова, **А.Д. Мухаметзянова**, М.Р. Шарипова // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века». Москва: 2012. - С. 616-617.

16. **Мухаметзянова А.Д.** Использование микробных фитаз для создания систем продукции препаратов медицинского назначения / А.Д. Мухаметзянова, И.И. Маренова, М.Р. Шарипова // Сборник материалов XI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». Казань: 2012. – С. 47.
17. Маренова И.И. Фитазы микроорганизмов как основа новых биоудобрений для улучшения роста растений / И.И. Маренова, **А.Д. Мухаметзянова**, М.Р. Шарипова // Электронный сборник материалов III-й Межрегиональной конференции молодых ученых и инноваторов «ИННО-КАСПИЙ», секция «Сельское хозяйство». Астрахань: 2012.
18. **Мухаметзянова А.Д.** Микробное получение инозитолпентафосфатов для применения в медицине / А.Д. Мухаметзянова, И.И. Маренова, М.Р. Шарипова // Электронный сборник материалов III-й Межрегиональной конференции молодых ученых и инноваторов «ИННО-КАСПИЙ», секция «Биология и биоинженерия». Астрахань: 2012.
19. **Mukhametzyanova A.** Isolation, purification and properties of Pantoea agglomerans phytase” / A.D. Mukhametzyanova, M.R. Sharipova // Abstracts of the 16th annual Symposium of Biology Students in Europe «SymBioSE-Hungary». Godollo: 2012. – P. 92.
20. **Мухаметзянова А.Д.** Микробное получение инозитолпентафосфатов - потенциальных терапевтических агентов / А.Д. Мухаметзянова // Сборник материалов конференции «Ломоносов 2012», секция «Биоинженерия и биоинформатика». Москва: 2012.
21. Маренова И.И. Фитазы микроорганизмов как основа новых биоудобрений для улучшения роста растений /И.И. Маренова, **А.Д. Мухаметзянова** // Сборник материалов Открытого конкурса научных работ студентов и аспирантов им. Н.И. Лобачевского. Казань: 2012. – С. 1-2.
22. **Мухаметзянова А.Д.** Получение изомеров инозитолпентафосфатов с помощью фитаз микроорганизмов / А.Д. Мухаметзянова, И.И. Маренова, М.Р. Шарипова // Сборник материалов Открытого конкурса научных работ студентов и аспирантов им. Н.И. Лобачевского. Казань: 2012. - С. 49-50.
23. **Mukhametzyanova A.D.** Phytases of Microorganisms – the Basis of New Biofertilizers for Plant Growth Promotion / A.D. Mukhametzyanova, M.R.Sharipova // Materials of III Annual International Scientific Conference in Biology. Tblisi: 2011. – P. 59.
24. **Mukhametzyanova A.** Characterization of *B. subtilis* strain with the knocked-out phytase gene / A.D. Mukhametzyanova, I.I. Marenova, A.I. Akhmetova, M.R. Sharipova // Abstracts of the 15th annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE-Switzerland”. Basel: 2011. – P. 39.
25. Akhmetova A. Identification of bacteria with high phytate degrading activity / Akhmetova A.I., **Mukhametzyanova A.D.**, Sharipova M.R. // Abstracts of the 15th annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE-Switzerland ”. Basel: 2011. – P. 9.
26. Тойменцева А.А. Филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19 / А.А. Тойменцева, **А.Д. Мухаметзянова**, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов Российской школы для молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Казань: 2010. – С. 59.

27. Ахметова А.А. Изоляция бактерий с высоким уровнем секреции фермента, гидролизующего фитат / А.И. Ахметова, **А.Д. Мухаметзянова**, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов Российской школы для молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Казань: 2010. – С. 11.
28. **Мухаметзянова А.Д.** Идентификация продуцентов фитаз, выделенных из образцов почвы республики Татарстан / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов Российской школы для молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Казань: 2010. – С. 42.
29. **Mukhametzyanova A.** Phytase / A. Mukhametzyanova, M.R. Sharipova, S. Schnell, A.R. Kayumov // Abstracts of XIV International Conference devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig-Universitat Giessen “Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine” . Kazan: 2009. – P. 123.
30. **Mukhametzyanova A.** Knock-out of the phytase gene in *Bacillus subtilis* genome / A.D. Mukhametzyanova, A.R. Kayumov, M.R. Sharipova // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe – “SymBioSE-Russia”. Kazan: 2009. – P. 61.

Е-mail автора: aliya.kzn@gmail.com

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание КФУ, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой Зинаиде Ивановне., факс: (843) 238-76-01.
Е-mail: ziabramova@mail.ru